Investigating the immunomodulatory effects of extracellular vesicles and cell-free liquid of the probiotic bacteria *Bacillus coagulans* Hammer on colon cancer cell line HT-29

Maryam Mashhoori Vayghan[1], Abbas Yadegar [2,3,*], Parvaneh Saffarian[1], Maryam Tajabadi Ebrahimi[4], Hamid Asadzadeh Aghdaei[5]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2-Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3-Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Department of Biology, Faculty of Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5-Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Bacillus coagulans Hammer is a Gram-positive probiotic that releases extracellular vesicles (EV). These vesicles contain the surface proteins of the bacteria, which are able to stimulate the immune system. For newborns or immunosuppressed people, the use of these extracellular vesicles is much less dangerous. As a result, the use of these vesicles causes a change and improvement in the inflammatory responses. In this study, our aim is to investigate the changes in immune responses after using extracellular vesicles and cell-free liquid of B. coagulans Hammer on HT-29 cells, as a colon cancer cell line.

Materials and Methods: B. coagulans hammer EVs were extracted using polyethylene glycol. Cell-free supernatant was prepared, and HT-29 cells were treated with a concentration of 10 µg/mL of EVs and a dilution of 20% v/v. The RT-qPCR method was used to assess the expression levels of inflammatory genes IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, and TGF-β, and the ELISA method was used to assess the levels of TGF-β and TNF-α cytokines produced in the case.

Results: The results obtained from RT-qPCR showed that the EVs and Cell Free Supernatant can reduce the expression of inflammatory genes IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and increase the expression of anti-inflammatory genes IL-10 and TGF-β. TNF-α and TGF-β cytokines have been examined by the ELISA method also shows an increase in TGF-β and a decrease in TNF-α in the treated cells.

Conclusion: The results showed that the B. coagulans Hammer Extracellular Vesicles and Cell Free Supernatant are capable of increasing anti-inflammatory responses, in contrast to reducing inflammatory responses.

Keywords: Bacillus coagulans Hammer, Probiotics, Immunomodulatory effects, Extracellular vesicles, HT-29 cell line

***Corresponding author:**
Associate Professor, Director, Foodborne and Waterborne Diseases Research Center,Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran .
Email: a.yadegar@sbmu.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

بررسی اثرهای تعدیل‌کنندگی ایمنی وزیکول‌های خارج‌سلولی و مایع فاقد سلول باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس همر* بر روی ردهٔ سلولی سرطان رودهٔ بزرگ HT-29

مریم مشهوری وایقان[۱]، عباس یادگار [۲،۳،*]، پروانه صفاریان[۱]، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی[۴]، حمید اسدزاده عقدایی[۵]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم‌پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- گروه بیولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *باسیلوس کوآگولانس همر* (*Bacillus coagulans Hammer*) یک گونهٔ پروبیوتیک غیرپاتوژن و گرم‌مثبت است که قادر به آزادسازی وزیکول‌های خارج‌سلولی می‌باشد. این وزیکول‌ها حاوی پروتئین‌های سطحی خودِ باکتری می‌باشند که قادر به تحریک سیستم‌ایمنی هستند. در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم‌ایمنی استفاده از این وزیکول‌های خارج‌سلولی در مقایسه با باکتری زنده، خطر بسیار کمتری دارد. در نتیجه استفاده از این وزیکول‌ها باعث ایجاد تغییر و بهبود در پاسخ‌های التهابی می‌شوند. در این مطالعه هدف ما بررسی تغییرهای ایجادشده در پاسخ‌های ایمنیِ بعد از استفاده از وزیکول‌های خارج‌سلولی و مایع فاقدسلولِ باکتریِ *B. coagulans Hammer* بر روی سلول‌های HT-29 به‌عنوان ردهٔ سلولیِ سرطان رودهٔ بزرگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه وزیکول‌های مشتق‌شده از باکتری *B. coagulans Hammer* با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول استخراج شدند. مایع فاقدسلول باکتری آماده‌سازی شد و سلول‌های HT-29 با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر وزیکول‌های مشتق‌شده و رقّت ۲۰ درصد حجمی‌حجمی مایعِ رویی فاقدسلول تیمار گردید. روش RT-qPCR جهت بررسی میزان بیان‌ژن‌های التهابی *IL-1β*، *IL-6*، *IL-8*، *IL-10*، *TNF-α* و *TGF-β* و نیز روش اِلایزا برای بررسی میزان سایتوکاین‌های TGF-β و TNF-α تولیدشده مورداستفاده قرار گرفت.

یافته ها: نتایج به‌دست‌آمده از RT-qPCR نشان داد که وزیکول‌های مشتق‌شده و مایعِ فاقدسلول باکتری به‌خوبی قادر به کاهش بیان‌ژن‌های التهابی IL-1β ، IL-8، IL-6 و TNF-α و افزایش بیان‌ژن‌های غیرالتهابی IL-10، TGF-β شده‌اند. بررسی سایتوکاین‌ها به‌روش اِلایزا نیز نشان‌دهندهٔ افزایش TGF-β و کاهش TNF-α در سلول‌های تیمارشده است.

نتیجهٔ گیری: نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد وزیکول‌ها و مایع فاقدسلولِ باکتری B. coagulans Hammer علاوه‌بر کاهش پاسخ‌های التهابی قادر به افزایش پاسخ‌های غیرالتهابی نیز هستند.

واژگان کلیدی: Bacillus coagullans Hammer، پروبیوتیک، پاسخ التهابی، وزیکول‌های خارج‌سلولی، ردهٔ سلولی HT-29

نویسنده مسئول: رییس مرکز تحقیقات بیماری های منتقله از غذا و آب، بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

- پست الکترونیکی: a.yadegar@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

۱-مقدمه

پروبیوتیک‌ها به‌طورمعمول در میکروبیوتای روده وجود دارند که می‌توانند انسان را در مقابل بیماری‌ها محافظت و سیستم‌ایمنی را تقویت و تعدیل کنند از طرفی دارای خواص آنتی‌کارسینوژنیک نیز می‌باشند [۱]. یکی از جنس‌هایی که در ۵۰ سال گذشته به‌عنوان پروبیوتیک موردتوجه قرار گرفته است باسیلوس‌ها هستند که در بین آن‌ها گونهٔ *B. coagulans* به‌عنوان پروبیوتیک موردتأیید و بیشتر استفاده قرار گرفته است [۲]. *B. coagulans* ها قادر به تولید آنزیم‌های متنوعی هستند که علاوه‌بر اینکه در هضم غذا بسیار مؤثر است، قادر به تنظیم محیط میکروبیوم میزبان بوده و مانع رشد باکتری‌های پاتوژن می‌شوند. با توجه به توانایی این سویه در متعادل کردن پارامترهای کمی سیستم‌ایمنی و سلول‌های ایمنی، این سویه به‌طور مؤثری قادر به بهبود سیستم‌ایمنی میزبان است [۳].

B. coagulans باکتری تولیدکنندهٔ لاکتیک‌اسید، اسپورزا، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. بهینهٔ رشد آن در ۳۵-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و pH نزدیک به ۶ است و نیز قادر به تجزیهٔ گلوکز، مالتوز و مانیتول جهت تولید L-لاکتیک‌اسید می‌باشد و همچنین بیوتین و تیامین نیز از فاکتورهای اصلی تقویت رشد این باکتری است [۲]. در بررسی‌های بسیاری تأیید شده که *B. coagulans* باعث جلوگیری از سندروم رودهٔ تحریک‌پذیر، اسهال ناشی از آنتی‌بیوتیک، بیماری‌های التهابی روده و سرطان کولورکتال می‌شود. پروبیوتیک‌ها به‌علت اینکه سلول‌های زندهٔ باکتری هستند در برخی از افراد که دارای بیماری‌های حاد کُشنده و یا سیستم‌ایمنیِ سرکوب‌شده هستند و نوزادان نارس، قابل‌استفاده نمی‌باشند. به‌همین دلیل پژوهشگران دریافتند که وزیکول‌های خارج‌سلولی[1] (EV) این میکروارگانیسم‌ها شاید بتوانند کاندید مناسبی برای درمان در این دسته از افراد باشند [۴، ۵]. در سال‌های اخیر، مکمل‌های فاقد باکتری به‌عنوان محصول جایگزین برای کاهش خطرهای باکتریِ زنده، مخصوصاً در افراد با ریسک بالا مانند افرادی که دارای سیستم‌ایمنیِ سرکوب‌شده هستند توجه بسیاری را به خود جلب کرده است [۶].

در واقع وزیکول‌های خارج‌سلولی قادر به ایفای هر دو نقش فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی به‌وسیلهٔ فعال کردن سلول‌های هدف، تعامل بین سلولِ باکتری با باکتری‌های دیگر و یا با سلول میزبان هستند. با توجه به تعامل بین باکتری با باکتری، وزیکول‌های خارج‌سلولی می‌توانند باعث کاهش رشد میکروب‌های دیگر در محیط شوند [۴]. از طرفی وزیکول‌های خارج‌سلولی به‌علت توانایی خود در انتشار، عبور از موکوس و مهاجرت مستقیم بین بافت‌ها و یا واکنش با سلول‌های مختلف ایمنی مانند بافت بنیادی دارای مزیت نسبت به خودِ سلولِ کاملِ پروبیوتیکی هستند و چون ارتباط با سلول‌های بنیادی دارند در تکامل سیستم ایمنی و تحت‌تأثیر قرار دادن میکروبیوتا نقش دارند [۴, ۷].

سرطان رودهٔ بزرگ امروزه یکی از بیماری‌های اصلی تهدیدکنندهٔ سلامت انسان‌ها است که به‌علت عوارض جانبی ناشی از راه‌های درمان آن، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان داروی مکمل در طول درمان و بعد از بهبودی موردتوجه قرار گرفته است [۸]. پروبیوتیک‌ها به‌علت اینکه قادر به تنظیم هموستاز در فضای رودهٔ بزرگ هستند بسیار موردتوجه قرار گرفته‌اند و به‌علت اینکه باعث تحریک تولید فاکتورهای التهابی و سایتوکاین‌های تنظیمی مانند IFN-γ، IL-12، IL-10، IL-14 می‌شوند دارای اهمیت هستند [۹].

به همین علت در این مطالعه به بررسی اثرهای تعدیل‌کنندگی وزیکولِ خارج‌سلولیِ مشتق‌شده از *B. coagulans* و مایعِ رویی فاقدِ سلول[2] بر روی سلول‌های آدنوکارسینومای انسانی (HT-29) با بررسی میزان بیان‌ژن‌های *IL-1β*، *IL-6*، *IL-8*، *IL-10*، *TNF-α* و *TGF-β* پرداخته شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت باکتری پروبیوتیک

در مرحلهٔ اول سویهٔ *B. coagulans Hammer* (*ATCC31284*) از مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از طریق آب و غذا پژوهشکدهٔ گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد. سویهٔ موردنظر در محیط‌کشت BHI

[1] Extracellular vesivcles

[2] Cell Free Supernatant

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

آگار کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس یک لوپِ کامل از باکتری به محیط BHI مایع که حاوی ویتامین K1 با غلظت ۰/۵درصد w/v بود تلقیح شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور g× ۱۵۰ در شرایطِ هوازی قرار گرفت تا به جذب ۰/۵ در OD_{600} برسد.

۲-۲- آماده‌سازیِ محلول PEG برای استخراج وزیکول‌های خارج‌سلولی

در این روش از پودر پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) با وزن ۶۰۰۰ دالتون استفاده شد. ابتدا محلول سدیم‌کلراید ۱ مولار تهیه شد و سپس پلی‌اتیلن‌گلایکول با غلظت ۱۶درصد در محلول سدیم‌کلراید حل شد. سپس محلول در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد استریل‌شده و قبل از مصرف در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا محلول خنک شود [۱۰].

۲-۳- استخراج وزیکول‌های خارج‌سلولی

ابتدا باکتری *B. coagolans* بر روی دو عدد محیط‌کشت BHI agar به‌صورت جداگانه کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت تمام کلنی‌های رشد کرده را به ۵۰۰ سی‌سی محیط BHI broth منتقل و درون انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت ابتدا محلول حاوی باکتری را به فالکون انتقال داده و به‌مدت ۴۵ دقیقه با دور g×۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا سلول‌های باکتری به‌طور کامل ته‌نشین و یک محلول کاملاً شفافِ فاقدِ سلول باکتری به‌دست آید. در مرحلهٔ بعدی محلول شفاف به‌دست‌آمده را به فالکون استریل منتقل شد و با دور g×۱۰۰۰۰به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از اینکه کاملاً سلول‌های باکتری از محلول حذف شده و محلولِ شفاف به‌دست آمد، محلول PEG ۱۶ درصد هم‌حجمِ محلول سانتریفیوژ شده اضافه گردید. با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد اضافه شد و با حرکات آهسته محلول‌ها کاملاً مخلوط شدند و سپس به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در مرحلهٔ بعد محلول‌ها در g×۳۲۰۰ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به‌دست‌آمده برای اطمینان از عدم‌حضور PEGهای اضافی به‌مدت ۵ دقیقه با درب باز در کنار شعله خشک شد. سپس رسوب تمام فالکون‌ها در ۲ میکرولیتر محلول PBS به‌طور کامل حل شد و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای ادامهٔ مراحل قرار داده شد [۱۱، ۱۲].

۲-۴- آماده‌سازی مایعِ رویی فاقدِ سلولِ باکتری

محیط‌کشت BHI مایع حاوی باکتری بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دور g×۱۲۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایعِ رویی از فیلتر µm ۰/۴۵ عبور داده شد و برای مراحلِ بعدی در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۵- تصویربرداری با میکروسکوپِ الکترونیِ تابشی

تصویرِ میکروسکوپِ تابشی برای بررسی تغییرهای وزیکول‌های خارجیِ مشتق‌شده مورداستفاده قرار گرفت [۶]. نمونه‌ها به‌وسیلهٔ بافر PBS شسته شد و در محلول فیکساسیون که شامل پارافرمالدهید ۴ درصد، گلوترالدهید ۱ درصد در فسفات بافر ۰/۱ مولار است، غوطه‌ور و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از قرارگیری در تتروکسید اسمیوم به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و ۳ مرتبه با بافر PBS شست‌وشو داده شد و به‌طور کامل آب به‌وسیلهٔ رقت‌های متفاوتِ اتانول از نمونه خارج و به‌روش نقطهٔ انجماد نمونه‌ها خشک شد. در نهایت نمونه‌ها به‌وسیلهٔ لایهٔ نازک طلا پوشش داده شد و به کمک میکروسکوپ الکترونی FE-SEM (مدل4160- HITACHI S، جمهوری چک)، با میزان دقت ۵ نانومتر و بزرگنمایی ۲۰ تا ۳۰۰۰۰ برابر و ماکزیمم ولتاژ ۳۰KV، عکس‌برداری گردید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

۲-۶- بررسی پروفایل پروتئینی وزیکول‌های استخراج شده به‌روش SDS-PAGE

پروفایلِ پروتئینیِ وزیکول‌های استخراج‌شده با استفاده از ژل ۱۲ درصد سدیم دودسیل‌سولفات (SDS) بررسی شد.

۲-۷- تصویربرداری با میکروسکوپِ الکترونیِ روبشی

شکل و اندازهٔ وزیکول‌های خارج‌سلولی به‌وسیلهٔ میکروسکوپِ الکترونیِ روبشی بررسی شد. به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از نمونه روی یک شبکهٔ مسی ۴۰۰ مش با فیلم فرموار پوشش داده شده با کربن اضافه شد. بعد از ۲ دقیقه انکوباسیون و خارج کردن مایع اضافی با بلاتینگ، شبکه روی ۱۰ میکرولیتر اورانیل استات ۲ درصد (w/v) قرار داده شد. پس از لکه‌گذاری و تکرار مرحلهٔ آخر، توری در هوا خشک شد. در نهایت عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی TEM (Carl Zeiss, Oberkohen, Germany) انجام شد.

۲-۸- کشت ردهٔ سلولِ HT-29

به‌منظور انجام آزمون القا و مهار التهاب ایجادشده به کمک وزیکول‌های استخراج‌شدهٔ سویهٔ *B. coagulans* از ردهٔ سلولی HT-29 (C466) که منشا آن سلول‌های آدنوکارسینومایی است و از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید استفاده شد. محیط‌کشت مورداستفاده DMEM حاوی ۵ درصد FBS (Sigma-Aldrich)، ۱ درصد اسیدآمینهٔ غیرضروری (NEAA, Gibco) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین بود. سلول‌ها چندین نسل در فلاسک‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA (۰/۲۵ درصد) پاساژ داده شدند. سلول‌های تریپسینه‌شده در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند.

۲-۹- تیمار ردهٔ سلولیِ HT-29

سلول‌ها بعد از شمارش با تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول/چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت با غلظت (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ رویی فاقدسلول ۲۰ درصد (v/v) تیمار شدند و گروه تیمار نشده به‌عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شد.

۲-۱۰- تست اِلایزا برای بررسیِ آنتی‌بادی‌های TNF-α و TGF-β

بعد از ۲۴ ساعت مایعِ رویی از روی سلول‌های تیمارشده و نمونهٔ کنترل جمع‌آوری و برای انجام تست اِلایزا برای سایتوکاین‌های TNF-α و TGF-β به‌وسیلهٔ کیت Human ELISA TNF-α و Human ELISA TGF-β (شرکت کارمانیا پارس ژن، ایران) آماده‌سازی شد. به چاهک اول تا چهارم به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از استانداردهای شمارهٔ ۱تا ۴ اضافه شد و به‌میزان ۵۰ میکرولیتر به باقیِ چاهک‌ها نمونهٔ موردنظر اضافه و به‌مدت ۶۰ دقیقه بر روی شیکر با دور ۲۰۰ ×g در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، با استفاده از محلول شست‌وشو، پلیت‌ها ۳ مرتبه شست‌وشو داده شدند و به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه (Detection ab) به تمامیِ چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۶۰ دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ ×g در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، با استفاده از محلول شست‌وشو، پلیت‌ها ۳ مرتبه شست‌وشو داده شدند. به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول HRP-Avidin به تمامی‌چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر (حداقل دور ۲۰۰ ×g) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، با استفاده از محلول شست‌وشو پلیت‌ها ۵ مرتبه شست‌وشو داده شدند. به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از سوبسترا به تمامی‌چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در انتها ۲۵ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به تمامیِ چاهک‌ها اضافه شدند و جذب نمونه‌ها در دستگاه اِلایزاریدر در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

۲-۱۱- استخراج RNA سلولی، سنتز cDNA و RT-qPCR

RNA سلول‌ها بعد از تیمار با استفاده از کیت (Parstous Co., Mashhad, Iran) استخراج شدند و جهت بررسی‌های مولکولی در مراحلِ بعدی در دمای ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. غلظت RNAها به‌وسیلهٔ دستگاهٔ نانودراپ NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) بررسی شدند. سپس cDNA به‌وسیلهٔ کیت سنتز (Parstous Co., Mashhad, Iran) از RNA سنتز و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

در ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان بیان‌ژن‌های *IL-1β*، *IL-6* ، *IL-8*، *IL-10*، *TNF-α* و *TGF- β*در سطح نسخه‌برداری با کمک روش qRT-PCR با استفاده از مسترمیکس BioFACT ™ 2X Real-time PCR Master Mix (BioFACT Sout Korea) و با دستگاه Rotor- GENE ®Q (Qiagen Hilden, Germany) به‌روش سایبرگرین بررسی شدند. برای آماده‌سازیِ نمونه‌ها از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکسِ سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۲ میکرولیتر از cDNA سنتزشده استفاده شد و محلول با اضافه کردن آب‌مقطر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامهٔ مورداستفاده شامل دِناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل با ترتیب با دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه، دمای ۵۹-۶۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه تکرار شد. به‌عنوان نمونهٔ کنترلِ داخلی از ژن *β-actin* استفاده شد.

جدول ۱- توالیِ الیگونوکلئوتیدیِ پرایمرهای RT- Qpcr

ژن هدف	نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	اندازهٔ محصول (bp)	منبع
IL-1β	IL-1β -F	GCACGATGCACCTGTACGAT	64	[13]
	IL-1β -R	CACCAAGCTTTTTTGCTGTGAGT		
IL-6	IL-6-F	GCACTGGCAGAAAACAACCT	119	[14]
	IL-6-R	TCAAACTCCAAAAGACCAGTGA		
IL-8	IL-8-F	CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT	147	[15]
	IL-8-R	ATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA		
IL-10	IL-10-F	GTGATGCCCCAAGCTGAGA	105	[16]
	IL-10-R	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT		
TGF-β	TGF-β-F	GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA	143	[17]
	TGF-β-R	TTGGTTCAGCCACTGCCGTA		
TNF-α	TNF-α -F	CCCGATGACAAGCCTGTAG	127	[18]
	TNF-α -R	GATGGCAGAGAGGAGGTTGAC		
B-actin	B-actin-F	ATGTGGCCGAGGACTTTGATT	107	[19]
	B-actin-R	AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG		

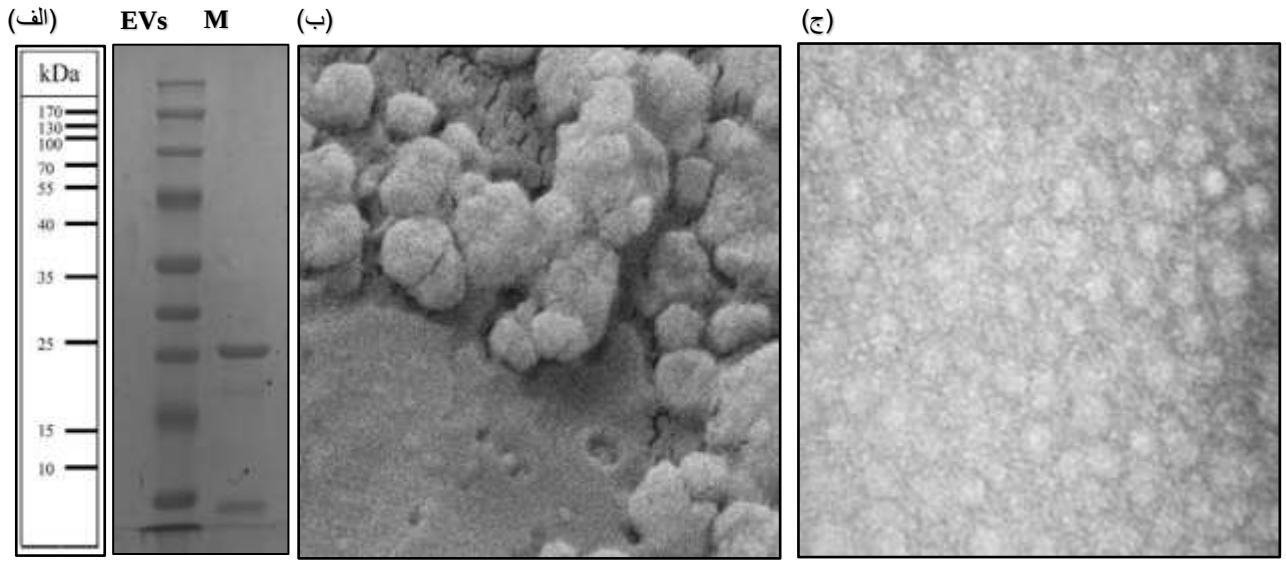
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

۲-۱۲- تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخهٔ ۸ (Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد. برای تعیین معناداریِ آماری بین گروه‌ها، داده‌ها با استفاده از تحلیلِ واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون Dunnett مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± SEM (خطای استاندارد میانگین) با سه آزمایش مستقل گزارش شد. $^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{**}p<۰/۰۰۱$ و $^{****}p<۰/۰۰۰۱$ برای نشان دادن معنادار بودن درنظر گرفته شد.

۲-۱۳- خصوصیات وزیکول‌های استخراج‌شده از سویهٔ *B. coagulans Hammer*

پروفایلِ پروتئینیِ وزیکول‌های استخراج‌شده به‌وسیلهٔ SDS-PAGE به‌دست آمد که نشان‌دهندهٔ پروتئین‌هایی در محدودهٔ بین ۱۰-۲۰۰ کیلودالتون بود (شکل ۱-الف). علاوه‌بر این غلظت پروتئینی به‌وسیلهٔ کیت BCA اندازه‌گیری شد که برابر با ۶۸۵/۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و بررسی‌های میکروسکوپیِ روبشی و تابشی از لحاظ مورفولوژیکیِ وزیکول‌های استخراج‌شده را با طیف بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر تأیید کردند (شکل ۱. ب-ج).



شکل ۱- (الف)وزیکول‌های خارجیِ استخراج‌شده از *B. Coagulans Hammer* بر روی ژل SDS-PAGE، که با روش کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شده است. مارکر در ژل نشان‌دهندهٔ باندهای پروتئینی بین ۱۰-۲۰۰ کیلودالتون است. (ب) عکس‌برداری از وزیکول‌های خارجیِ استخراج‌شده با میکروسکوپِ الکترونیِ تابشی، اندازهٔ وزیکول‌ها بین ۱۰۰-۳۰۰ نانومتر است. (ج) عکس‌برداریِ میکروسکوپِ الکترونیِ روبشی.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی بیان‌ژن‌های التهابی به‌وسیلهٔ وزیکول‌های استخراج‌شدهٔ *B. coagulans Hammer* و مایعِ رویی فاقدِ سلول در سلول‌های HT-29

تیمارِ سلول‌های HT-29 با وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلول کاهش معناداری در بیان‌ژن *IL-1β*، ($^{*}p<۰/۵$، $^{*}p<۰/۵$) به‌ترتیب نشان داد (شکل ۲-الف). همان‌طورکه در شکل ۲-ب نشان داده شد، وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلول باعث کاهش بیان *IL-6* ($^{**}p<۰/۰۱$، $^{**}p<۰/۰۱$) نیز شدند. این کاهش در بیان‌ژنِ *IL-8* نیز بعد از ۲۴ ساعت تیمار با وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلول ($^{**}p<0.01$, $^{**}p<0.01$) مشاهده شد (شکل ۲-ج). در بیان‌ژن *IL-10* بعد از تیمار، افزایش بیان نسبت به نمونهٔ تیمارنشده دیده شد، امّا معنادار نبود (شکل ۲-د). بیان‌ژن *TGF-β* هم بعد از تیمار با وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلول همچنین افزایش معناداری ($^{***}p<0.001$, $^{***}p<0.001$) را نشان داد (شکل ۲-ه). امّا در ژن *TNF-α* کاهشِ بیان بعد از

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

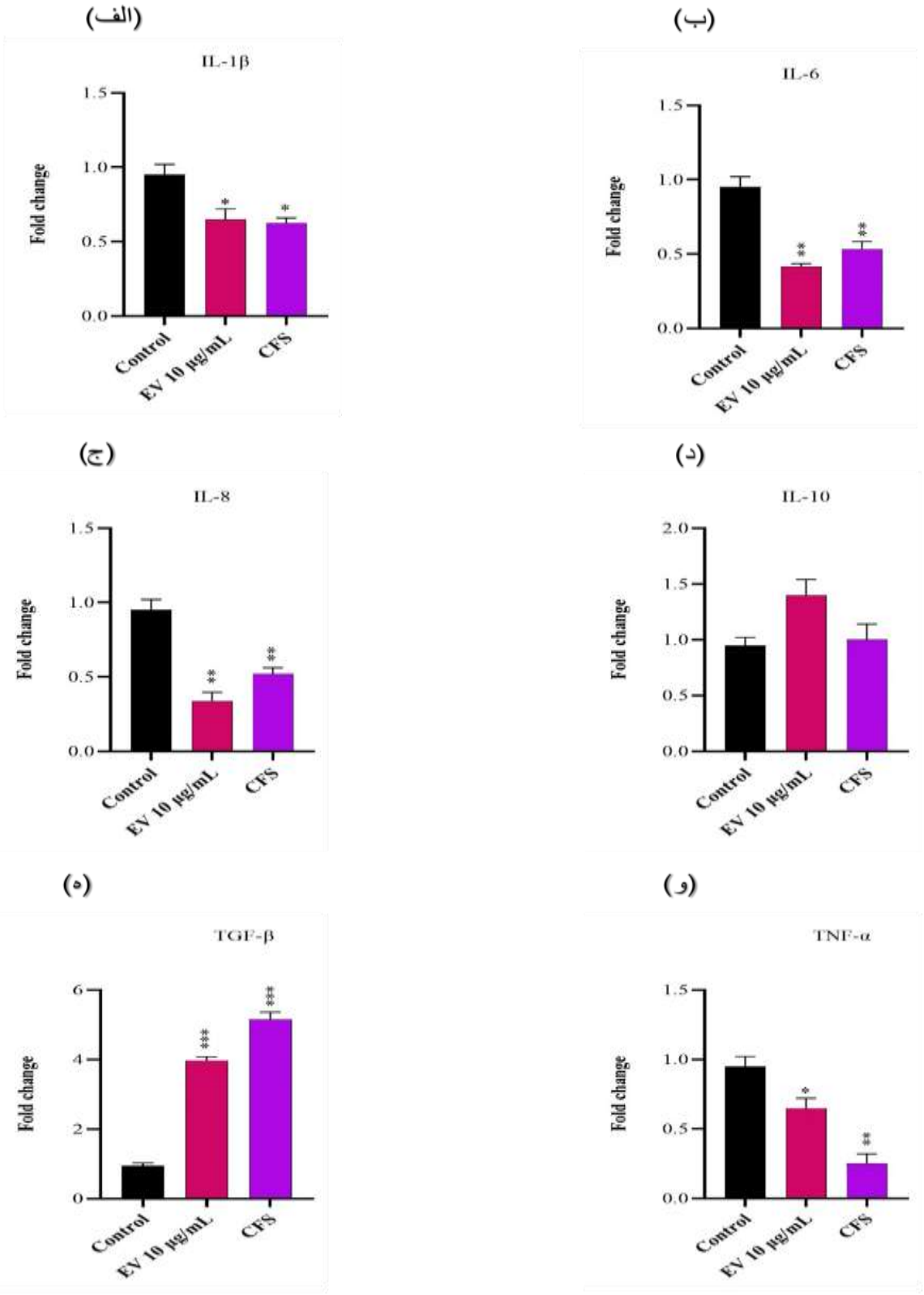
۲۴ ساعت تیمار با وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلول ($p<0.01$**, $p<0.5$*) معنادار بود (شکل۲-و).

همان‌طورکه در جدول ۲ نشان‌داده شد، درصد تغییرهای ژن‌های التهابی و غیرالتهابی در سلول‌های تیمارشده محاسبه شده است.

جدول ۲- درصد تغییرهای ایجادشده در سلول‌های HT-29 تیمارشده به‌وسیلهٔ وزیکول‌های خارجِ سلولی و مایعِ فاقدِ سلولی

ژن‌های التهابی و غیرالتهابی	وزیکول‌های خارج‌سلولی	مایعِ فاقدِ سلولی
IL-1β	٪۳۰↓	٪۳۲/۵↓
IL-6	٪۵۳↓	٪۴۱↓
IL-8	٪۶۱↓	٪۴۳↓
IL-10	٪۴۵↑	٪۵↑
TNF-α	٪۳۰↓	٪۷۰↓
TGF-β	٪۳۰↑	٪۴۲↑

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]



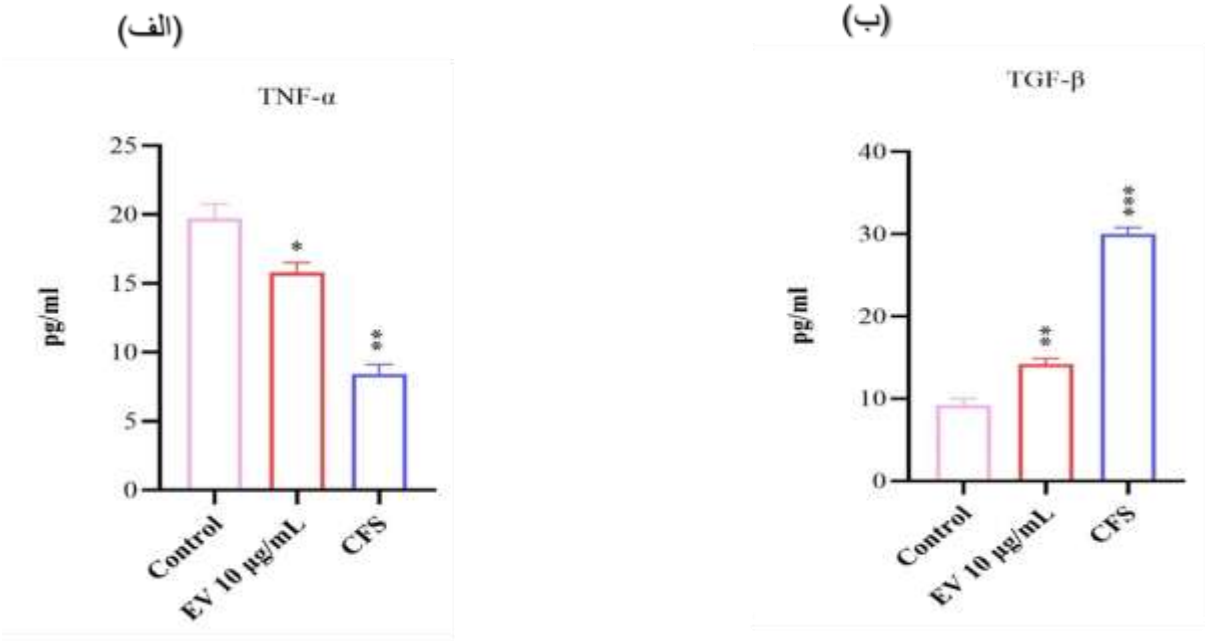
شکل ۲- بررسی اثر EV و CFS *باسیلوس کواگولانس* بر روی میزان بیان‌ژن‌های التهابی و ضدالتهابی (الف) *IL-1β* (ب) *IL-6* (ج) *IL-8* (د) *IL-10* ، (ه) *TGF-β* و (و) *TNF-α* بر روی ردهٔ سلولیِ HT-29. ردهٔ سلولی تحت‌درمان با (10µg/mL) EV و 20% CFS قرار گرفت.

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

۲-۳- تغییرهای سایتوکاین TGF-β و TNF-α

بررسی‌ها نشان دادند که تیمار سلول‌ها باعث تغییر در سطح سرمیِ سایتوکاینِ التهابی و مهاری مانند TNF-α و TGF-β شده است. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان داده شد تمام نمونهٔ تیمارشده به‌وسیلهٔ وزیکول‌های استخراج‌شده و مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری به‌ترتیب (*p<0.05 ,**p<0.01) باعث القای تغییرهای معناداری در سطحِ سرمیِ TNF-α ایجاد کرده‌اند (شکل ۳-الف). امّا در سایتوکاین TGF-β به‌عنوان سایتوکاین مهاری، مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری نسبت به وزیکول‌های استخراج‌شده قادر به ایجاد تغییرِ بیشتری بوده است که (**p<0.01 ,***p<0.001) تغییر معنادار بوده است (شکل ۳-ب).



شکل۳- بررسی اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی و مایعِ فاقدِ سلولِ باکتریِ *باسیلوس کواگولانس* بر روی میزان ترشح آنتی‌بادی‌های (الف) *TNF-α* و (ب) *TGF-β* بر روی ردهٔ سلولی HT-29. ردهٔ سلولی تحت‌درمان با (10µg/mL) EV و 20% CFS قرار گرفت. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

۴- بحث

تحقیقات در مورد باکتری‌های مفید روده مانند پروبیوتیک‌ها، اخیراً اهمیت بیشتری یافته است [۲۰]. مطالعات نشان داده است که استفاده از مکمل رژیم‌غذایی با سویه‌های پروبیوتیک به درمان بیماری‌هایی مانند بیماری‌های التهابی روده، اسهال و گاستروانتریت کمک می‌کند [۲۱]. اگرچه استفاده از پروبیوتیک‌ها سابقهٔ ایمنی استثنایی و ثابتی دارد [۲۲]، تحقیق Marteau و همکارانش نشان داده است که پروبیوتیک‌ها را با عوارض جانبیِ شدید، مانند عفونت‌های خطرناک به‌ویژه در برخی از گروه‌های جمعیتیِ آسیب‌پذیر مانند نوزادانِ نارس، بیماران بدحال و افراد دارای نقص ایمنی مرتبط می‌کند [۲۳]. در این راستا، مشخص شده است که برخی از اثرهای مفید اعمال‌شده توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند توسط عوامل ترشح‌شدهٔ باکتری [۲۴، ۲۵] یا توسط وزیکول‌های خارج‌سلولی آزادشده واسطه شود [۲۶، ۲۷]. در واقع، ایدهٔ استفاده از پروبیوتیک‌های پاستوریزه به‌عنوان مکمل‌های جایگزینِ ایمن، به‌ویژه در افراد در معرض خطر برای کاهش خطرهای احتمالیِ سویه‌های زنده، ایجاد شده است [۲۸]. در سال‌های اخیر مطالعه‌های زیادی بر روی اثرهای مفید وزیکول‌های خارج‌سلولیِ استخراج‌شده از سویه‌های پروبیوتیک انجام شده است [۲۸-۳۰]. علاوه‌بر این روش‌های مختلفی برای غیرفعال کردن سویه‌های پروبیوتیک از جمله گرما، شیمیایی، اشعهٔ گاما و UV نیز مورداستفاده قرار گرفته‌اند. باوجوداین، تأثیر آن‌ها بر ساختار سلولی و فعالیت تعدیل‌کنندهٔ

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

ایمنی همچنان روشن نیست [۳۱]. درحالی‌که پروبیوتیک‌هایی به‌خاطر اثرهای مفیدشان در برابر سرطان رودهٔ بزرگ موردمطالعه قرار گرفته‌اند، اثرهای پروبیوتیک *B. coagulan* به‌خوبی شناخته نشده است [۳۲]. در این مطالعه، هدف ما ارزیابی اثرهای مفید وزیکول‌های خارج‌سلولی و مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری بر روی سطح بیان‌ژن‌های التهابی و غیرالتهابی *(IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α,TGF-β)* توسط RT-qPCR و بررسی میزان سایتوکاین‌های TNF-α و TGF-β به‌روش اِلایزا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از ردهٔ سلولی HT-29 بوده است. در مطالعهٔ حاضر، شناسایی اولیهٔ *B. coagulans Hammer* وزیکول‌های خارج‌سلولی نشان داد که این نانوساختارها می‌توانند حاوی پروتئین‌های مختلفی باشند که ممکن است در ارتباط‌های بین‌سلولی و تعدیلِ پاسخ‌های ایمنیِ میزبان نقش داشته باشند [۳۳-۳۵]. علاوه‌بر این، خواص بیوفیزیکیِ وزیکول‌های خارج‌سلولی، از جمله اندازه که به‌روش میکروسکوپِ الکترونیِ تابشی و روبشی انجام شد، نتایج یکسانی با مطالعهٔ Rubio و همکارانش نشان داده است [۷، ۳۴، ۳۶]. بااین‌حال، پژوهش‌های بیشتری برای شناساییِ محتوای پروتئینیِ خاص وزیکول‌های خارج‌سلولی *B. coagulans Hammer* و نقش بالقوهٔ آن‌ها در تعدیل سیستم ایمنی در سلول‌های سرطانی موردنیاز می‌باشد. ازآنجاکه سرطان رودهٔ بزرگ سومین رخداد شایع و چهارمین عامل مرگ بر اثر سرطان در دنیا است. فعال شدن NF-κB در سرطان کولورکتال به‌وسیلهٔ سایتوکاین‌های گسترش تومور مانند TNF، IL-1 و IL-17 می‌باشد [۳۷]. فعال شدن *NF-κB* منجر به تولید سایتوکاین‌هایی می‌شود که به‌عنوان فاکتور رشد در سلول‌های آنتروسیت بدخیم عمل می‌کنند که شامل IL-11، IL-6، IL-1β و TNF-α است [۳۸]. سایتوکاین‌هایی مانند IL-10 و TGF-β مانع تومورزایی در کولورکتال می‌شوند. IL-6 در تحریک تقسیم سلول‌های بدخیم آنتروسیت‌ها نقش دارند [۳۹]. همان‌طورکه در بررسیِ حاضر نشان داده شد وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده باعث کاهش ۵۳ درصد و مایعِ رویی فاقدِ سلولی باعث کاهش ۴۱ درصد در میزان بیان‌ژن *IL-6* در سلول‌ها شده است. TNF نیز در طیِ پاسخ‌های اولیهٔ التهابی تولید می‌شود که شروع و ادامهٔ فعالیت برخی سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و مولکول‌های اتصال اندوتلیال را انجام می‌دهد. ممانعت از TNF باعث کاهش تومور در سرطانِ کولورکتال می‌شود. طبق نتایج به‌دست‌آمده سلول‌های تیمارشده با وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده قادر به کاهش ۳۰ درصد و مایعِ فاقدِ سلولی قادر به کاهش ۷۰ درصد بیان‌ژن *TNF-α* شده‌اند که مطابق با نتایج Rafater و همکارانش است [۴۰]. IL-1 نیز در مراحل اولیهٔ پاسخ التهابی تولید می‌شود که واسطهٔ تومورزایی در سرطان‌های گوارشی است [۴۱]. در مطالعهٔ اخیر نیز میزان بیان‌ژن *IL-1β* در سلول‌های تیمارشده با وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده ۳۰ درصد و در سلول‌های تیمارشده با مایعِ رویی فاقدِ سلول ۳۲/۵ درصد کاهش داشته است. در بررسی دیگری که توسط Fabrega و همکارانش انجام شده است نشان داده‌شده که *B. coagulans* به‌طور مؤثری باعث کاهشِ پاسخ‌های التهابی شده و دارای اثرهای ضدالتهابی است و از طرف دیگر نیز باعث کاهش سایتوکاین‌های التهابی به‌وسیلهٔ ممانعت از فعالیت *NF-κB* می‌شود [۲۶]. *TGF-β* دارای نقش متضاد در گسترش سرطان می‌باشد. در واقع نقش آنتی‌توموری به‌وسیلهٔ ممانعت از رشد، تحریک آپوپتوز و سرکوب بیان سایتوکاین‌های پروتومورزایی دارد. سیگنال‌دهی مناسب *TGF-β* در سلول‌های T برای پیشگیری از بدخیمی نیاز است و غیرفعال شدن *TGF-βRII* یا Smad4 در سلول‌های T منجر به افزایش تومورزایی سرطان می‌شود [۴۲]. از طرف دیگر در پروسهٔ بدخیمی *TGF-β* انتقال سلول‌های مزانشیمال اپیتلیال را افزایش داده و فعالیت ضدتوموری سلول‌های ایمنی را سرکوب می‌کند تا متاستاز تسهیل شود [۴۳]. تحقیقات Sepehr و همکارانش نیز نشان داده است که کاهش سیگنال‌دهیِ مسیر *TGF-β* دارای اثرهای آنتی‌توموری می‌باشد [۴۴]. مهم‌ترین یافتهٔ کلیدی مطالعهٔ ما این بود که درمان با *B. coagulans Hammer* وزیکول‌های خارج‌سلولی ۳۰ درصد و مایعِ رویی فاقدِ سلول ۴۲ درصد بیان‌ژن آنتی‌توموریِ *TGF-β* را در سلول‌های سرطانیِ کولون HT-29 افزایش داده‌اند. این یافته‌های اولیه اهمیت کاوش بیشتر در هر دو بخشِ مرتبط با وزیکول‌های خارج‌سلولی و اجزای محلولِ مشتق‌شده از *B. coagulans Hammer* را به‌عنوان محرّک‌های بالقوهٔ تعدیل‌کنندهٔ ایمنی نشان می‌دهند. فعالیت زیستیِ قوی‌ترِ وزیکول‌های خارج‌سلولی ممکن است به‌وجود محموله‌های متصل به غشا و فاقد ترشحات بدونِ سلول نسبت داده شود، امّا پژوهش‌های بیشتری برای روشن کردن تعامل دقیق آن‌ها با سلول‌های سرطانی موردنیاز است. وزیکول‌های مشتق‌شده قادر به کاهش بیان ۵۳ درصد ژن *IL-6* در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده نشان داده‌اند درصورتی‌که مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری قادر به کاهش ۴۱ درصد بوده است، *IL-8* یک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

سایتوکین فعال‌کنندهٔ کِموتاکتیک لکوسیتی جدید (کموکین)، توسط انواع مختلفی از سلول‌ها بر اثر تحریک با محرّک‌های التهابی تولید می‌شود و عملکردهای مختلفی بر روی لکوسیت‌ها، به‌ویژه نوتروفیل‌ها در شرایط آزمایشگاهی اعمال می‌کند [۴۵]. در این پژوهش نیز نشان داده شد که وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده قادر به کاهش ۶۱ درصد بیان ژن و مایعِ رویی فاقدِ سلول قادر به کاهش ۴۳ درصد بیان این ژن بوده‌اند. با توجه به اینکه اینترلوکین IL-10 یک سایتوکاین تنظیم‌کنندهٔ ایمنی مهم است که تقریباً توسط همهٔ انواع سلولی درون ذاتی تولید می‌شود [۴۶]. وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده نیز باعث افزایش ۴۵ درصد بیان این ژن شده‌اند درحالی‌که مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری تنها قادر به افزایش ۵ درصدی بیان‌ژن شده است.

۵- نتیجه‌گیری

وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده و مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری *B. coagulans Hammer* می‌توانند باعث کاهش بیان‌ژن‌های التهابی *IL-1β*، *IL-6*، *IL-8* و *TNF-α* شوند و از طرفی بیان‌ژن‌های ضدالتهابی *IL-10* و *TGF-β* را افزایش می‌دهند که رابطهٔ مستقیم با گسترش سرطان کولورکتال دارند. از طرفی باعث افزایش سایتوکاین TGF-β و کاهش *TNF-α* شده‌اند که نشان‌دهندهٔ اثرهای بالقوه در ردهٔ سلولی HT-29 می‌باشند. با توجه به این نتایج پیشنهاد می‌شود که مکانیسم مولکولیِ عملکردِ وزیکول‌های خارج‌سلولی و مایعِ فاقدِ سلولِ باکتری *باسیلوس کواگولانس* با بررسی سایر ژن‌های دخیل در دیگر مسیرهای التهابی و غیرالتهابی و تولید سایتوکاین‌ها موردبررسی قرار گیرد. علاوه‌بر این پیشنهاد می‌شود که اثرهای دیگر فرم‌های غیرفعال‌شدهٔ باکتری نیز بر روی مسیرهای گسترشِ تومور و مسیرهای التهابی بررسی شود.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیهٔ کارکنان آزمایشگاهٔ مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقلهٔ از آب و غذا، واقع در پژوهشکدهٔ بیماری‌هاش گوارش و کبد، دانشگاهٔ علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین گروهٔ زیست شناسی دانشگاهٔ آزاد اسلامی‌واحد علوم و تحقیقات تهران صمیمانهٔ تشکر میکنند.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافعی ندارد.

۹- سهم نویسندگان

مریم مشهوری وایقان: اجرای بخش علمیِ پژوهش، تحلیل‌وتفسیر داده‌ها و نگارش مقاله. پروانه صفاریان: نگارش و ویرایش مقاله. مریم ابراهیمی تاج‌آبادی: نگارش و ویرایش مقاله. حمید اسدزاده عقدایی: مشاور بالینی. عباس یادگار: طراحی مطالعه، تحلیل‌وتفسیر داده‌ها، نگارش و ویرایشِ نهاییِ مقاله.

۱۰- کد اخلاق

IR.IAU.SRB.REC.1402.285

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

۱۱- منابع

1.Konuray, G. and Z. Erginkaya, *Potential Use of Bacillus coagulans in the Food Industry.* Foods, 2018. 7(6).
2.Ghavami, S.B., et al., *Immunomodulation and generation of tolerogenic dendritic cells by probiotic bacteria in patients with inflammatory bowel disease.* International journal of molecular sciences, 2020. 21(17): p. 6266.
3.Cutting, S.M., *Bacillus probiotics.* Food Microbiol, 2011. 28(2): p. 214-20.
4.Molina-Tijeras, J.A., J. Gálvez, and M.E. Rodríguez-Cabezas, *The Immunomodulatory Properties of Extracellular Vesicles Derived from Probiotics: A Novel Approach for the Management of Gastrointestinal Diseases.* Nutrients, 2019. 11(5).
5.Brown, L., et al., *Extracellular vesicles produced by the G ram-positive bacterium B acillus subtilis are disrupted by the lipopeptide surfactin.* Molecular microbiology, 2014. 93(1): p. 183-198.
6.Keshavarz Azizi Raftar, S., et al., *The protective effects of live and pasteurized Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles against HFD/CCl4-induced liver injury.* Microbiology Spectrum, 2021. 9(2): p. e00484-21.
7.Rubio, A.P.D., et al., *Transcytosis of Bacillus subtilis extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model.* Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 3120.
8.Liong, M.T., *Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence.* Int J Mol Sci, 2008. 9(5): p. 854-863.
9.Rafter, J., *Probiotics and colon cancer.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. 17(5): p. 849-59.
10.Ebrahimi Vargoorani, M., et al., *A polyethylene glycol-based method for extraction of extracellular vesicles from Lactobacillus casei as vaccine delivery vehicle.* Vaccine Research, 2018. 5(2): p. 57-62.
11.García-Romero, N., et al., *Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation.* Journal of translational medicine, 2019. 17: p. 1-11.
12.Rider, M.A., S.N. Hurwitz, and D.G. Meckes, *ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles.* Scientific reports, 2016. 6(1): p. 1-14.
13.Kim, K., et al., *Gryllus bimaculatus Extract Protects against Lipopolysaccharide-Derived Inflammatory Response in Human Colon Epithelial Caco-2 Cells.* Insects, 2021. 12(10).
14.Chow, A.W., et al. ,*Polarized secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 by human airway epithelia 16HBE14o- cells in response to cationic polypeptide challenge.* PLoS One, 2010. 5(8): p. e12091.
15.Zhang, H.J., et al., *Microvesicles with mitochondrial content are increased in patients with sepsis and associated with inflammatory responses.* World J Clin Cases, 2023. 11(2): p. 342-356.
16.Strong, A.L., J.M. Gimble, and B.A. Bunnell, *Analysis of the Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Secreted by Adult Stem Cells during Differentiation.* Stem Cells Int, 2015. 2015: p. 412467.
17.Wang, J., et al., *TGF-β and TGF-β/Smad signaling in the interactions between.* PloS one, 2013. 8: p. e55379.
18.Salemi, S., et al., *Detection of interleukin 1β (IL-1β), IL-6, and tumor necrosis factor-α in skin of patients with fibromyalgia.* The Journal of rheumatology, 2003. 30: p. 146-50.
19.Bolori, S., et al., *The Effects of Helicobacter pylori-Derived Outer Membrane Vesicles on Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis In Vitro.* BioMed Research International, 2023. 2023(1): p. 4848643.
20.Ziaeifar, E., A. Goodarzi, and N. Saki, *The role of microbiota, probiotics and prebiotics in dermatology.* Dermatology and Cosmetic, 2019. 10(1): p. 44-51.
21.Brown, A.C. and A. Valiere, *Probiotics and medical nutrition therapy.* Nutrition in clinical care: an official publication of Tufts University, 2004. 7(2): p. 56.
22.Molina-Tijeras, J.A., J. Gálvez, and M.E. Rodríguez-Cabezas, *The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: a novel approach for the management of gastrointestinal diseases.* Nutrients, 2019. 11(5): p. 1038.
23.Marteau, P. and F. Shanahan, *Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side–effects.* Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2003. 17(5): p. 725-740.
24.Ewaschuk, J.B., et al., *Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function.* American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology, 2008. 295(5): p. G1025-G1034.
25.Martín, R., et al., *Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model.* BMC microbiology, 2015. 15: p. 1-12.
26.Fábrega, M.-J., et al ,*Intestinal anti-inflammatory effects of outer membrane vesicles from Escherichia coli Nissle 1917 in DSS-experimental colitis in mice.* Frontiers in microbiology, 2017. 8: p. 1274.
27.Bielig, H., et al., *A role for quorum sensing in regulating innate immune responses mediated by Vibrio cholerae outer membrane vesicles (OMVs).* Gut Microbes, 2011. 2(5): p. 274-279.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

28.Fakharian, F., et al., *Immunomodulatory effects of live and pasteurized Lactobacillus crispatus strain RIGLD-1 on Helicobacter pylori-triggered inflammation in gastric epithelial cells in vitro.* Molecular Biology Reports, 2023. 50(8): p. 6795-6805.
29.Behzadi, E., H.M. Hosseini, and A.A.I. Fooladi, *The inhibitory impacts of Lactobacillus rhamnosus GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells.* Microbial pathogenesis, 2017. 110: p. 1-6.
30.Keshavarz Alikhani, H., et al., *Application of stem cell-derived extracellular vesicles as an innovative theranostics in microbial diseases.* Frontiers in Microbiology, 2021. 12 :p. 785856.
31.Deshpande, G., G. Athalye-Jape, and S. Patole, *Para-probiotics for preterm neonates—The next frontier.* Nutrients, 2018. 10(7): p. 871.
32.Madempudi, R.S. and A.M. Kalle, *Antiproliferative effects of Bacillus coagulans unique IS2 in colon cancer cells.* Nutrition and cancer, 2017. 69(7): p. 1062-1068.
33.Jnana, A., et al., *Extracellular vesicles in bacterial and fungal diseases–Pathogenesis to diagnostic biomarkers.* Virulence, 2023. 14(1).
34.Ñahui Palomino, R.A., et al., *Microbiota–host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language.* PLoS Pathogens, 2021. 17(5): p. e1009508.
35.Bose, S., et al., *Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria.* Microbial Cell, 2020. 7(12): p. 312.
36.Rodovalho, V.d.R., et al., *Environmental conditions modulate the protein content and immunomodulatory activity of extracellular vesicles produced by the probiotic Propionibacterium freudenreichii.* Applied and Environmental Microbiology, 2021. 87(4): p. e02263-2۰,
37.Yang, L. and Z. Pei, *Bacteria, inflammation, and colon cancer.* World journal of gastroenterology: WJG, 2006. 12(42): p. 6741.
38.Francuz, T., et al., *The role of inflammation in colon cancer pathogenesis.* Advances in Hygiene and Experimental Medicine, 2016. 70: p. 360-366.
39.Wei, X., et al., *Analysis of the role of the interleukins in colon cancer.* Biological Research, 2020. 53: p. 1-9.
40.Rafter, J., *Probiotics and colon cancer.* Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2003. 17(5): p. 849-859.
41.Wang, X., et al., *Inflammatory cytokines IL-17 and TNF-α up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells.* Immunology letters, 2017. 184: p. 7-14.
42.Shawki, S., et al., *Colon cancer: inflammation-associated cancer.* Surgical Oncology Clinics, 2018. 27(2): p. 269-287.
43.Bellam, N. and B. Pasche, *TGF-β signaling alterations and colon cancer.* Cancer genetics, 2010: p. 85-103.
44.Sepehr, A., et al., *Role of Native Probiotic Lactobacillus Species via TGF-β Signaling Pathway Modulation in CRC.* Iran Biomed J, 2024. 28(4): p. 168-78.
45.Harada, A., et al., *Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation.* Journal of Leukocyte Biology, 1994. 56(5): p. 559-564.
46.Glocker, E.-O., et al., *IL-10 and IL-10 receptor defects in humans.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. 1246(1): p. 102-107.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]